

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620121152449

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

TNF 诱导 RIP3 依赖的 NADH 消耗增加

TNF induced RIP3-dependent NADH depletion

张丽芳

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____ 教授

评 阅 人: _____

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 能诱导 L929 细胞产生相互作用蛋白 3 (receptor-interacting protein 3, RIP3) 依赖的程序性细胞坏死, 并且在该过程中, 胞内的线粒体产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 会积聚, 同时当 RIP3 的表达水平敲低时, 胞内 ROS 的积聚也受到了抑制。但是 RIP3 如何影响 ROS 的具体机制仍不清楚。

因为 ROS 的产生主要在线粒体电子传递链上, 而还原型辅酶 I (NADH) 和还原型辅酶 II (NADPH) 又是电子传递链的底物, RIP3 是否能够通过改变电子传递链上 NADH 或者 NADPH 的消耗来影响 ROS。我们通过实验证明了 TNF 确实能诱导 L929 细胞产生 RIP3 依赖的 NADH 消耗的增加, 然而对 NADPH 的消耗不产生影响, 而且 ROS 的去除剂能够抑制这种 NADH 消耗增加的现象。但是 NADH 的消耗并非如我们最初假设那般是由线粒体电子传递链上的组分导致的, 同时我们也证明 ROS 不能直接引起 NADH 的消耗, 而是由线粒体上的某种蛋白所介导。为了能够解释 TNF 诱导 RIP3 依赖的 NADH 消耗增加及其与 ROS 的关系, 我们将线粒体蛋白具有 NADH 活性的组分进行分离纯化, 并通过银染的方法, 得到了一些特异性的条带。我们将通过质谱的方法对这些特异性的条带进行鉴定。希望能通过鉴定的结果对 TNF 诱导 RIP3 依赖的 NADH 消耗增加及其与 ROS 的关系做一个更深入的研究。

关键词: 肿瘤坏死因子; 相互作用蛋白 3; 还原型辅酶 I

Abstract

TNF (Tumor necrosis factor) can induce necrosis in L929 cells which is RIP3 dependent. ROS (reactive oxygen species) production increase during this process which is also RIP3 dependent, RIP3 expression knockdown inhibits the accumulation of ROS. But the mechanism of how RIP3 affect the ROS production is unknown.

ROS is generated mostly through the ETC (electron transport chain) of mitochondria, and the common substrates of this process are NADH and NADPH. So it might be possible that RIP3 can affect the ROS production through the NADH or NADPH depletion. In our experiment we proved that TNF can induce RIP3-dependent NADH depletion. And it is NADH specific, NADPH is not involved in this process. Also ROS scavengers inhibit the NADH depletion, which means ROS participate in the RIP3-dependent NADH depletion. But the later experiments showed that mitochondrial ECT complex I, which oxidizes NADH in ECT is no responsible for the NADH depletion since the ECT inhibitors we used can't block this RIP3-dependent NADH depletion. And then we proved that this TNF-induced RIP3-dependent NADH depletion is mediated by some protein of mitochondria, ROS couldn't oxidize NADH directly. In order to find out which protein of mitochondria that is involved, we purified mitochondrial proteins that have NADH depletion activity through a series of purification methods. We are going to indentified those proteins through MS, hopefully we can have a better insight of TNF-induced RIP3-dependent NADH depletion, and what's the role of ROS in it.

Keywords: TNF;RIP3; NADH

目 录

中文摘要	I
英文摘要	I
中文目录	II
英文目录	III
第一章 前 言	1
1.1 细胞坏死.....	1
1.1.1 细胞凋亡与细胞坏死.....	1
1.1.2 细胞坏死的机制.....	2
1.1.2.1 细胞坏死的受体和配基	3
1.1.2.2 细胞坏死的分子机制	4
1.1.2.3 ROS 在细胞坏死中的作用	7
1.2 肿瘤坏死因子（TNF）诱导的细胞坏死和凋亡.....	7
1.2.1 TNF 简介	7
1.2.2 TNF 诱导细胞坏死和凋亡.....	8
1.2.3 TNF 诱导 RIP3 介导的细胞坏死	8
1.3 受体相互作用蛋白 3（RIP3）	9
1.3.1 RIP 家族简介	9
1.3.2 RIP 家族的结构特点	10
1.3.3 RIP3 是细胞凋亡和细胞坏死相互转换的分子开关	10
1.4 立题背景.....	11
第二章 材料与方 法	13
2.1 药品与试剂.....	13
2.2 实验仪器.....	13
2.3 分子克隆实验与方 法.....	14

2.3.1 质粒载体.....	14
2.3.1.1 RNA 干扰载体.....	14
2.3.2 大肠杆菌感受态细胞制备.....	15
2.3.3 质粒转化.....	15
2.3.4 质粒 DNA 提取.....	16
2.3.4.1 小规模质粒提取.....	16
2.3.4.2 中等规模质粒 DNA 提取.....	16
2.3.4.3 大规模质粒 DNA 提取.....	17
2.3.5 质粒 DNA 的限制性内切酶处理方法.....	18
2.3.5.1 质粒 DNA 的限制性内切酶消化.....	18
2.3.6 目的 DNA 片段的扩增.....	18
2.3.7 目的 DNA 扩增片段纯化.....	18
2.3.7.1 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA.....	18
2.3.7.2 DNA 的回收.....	19
2.3.8 目的 DNA 的连接反应.....	19
2.4 细胞相关实验.....	20
2.4.1 细胞培养.....	20
2.4.1.1 细胞培养液使用说明.....	20
2.4.1.2 PBS 和细胞培养液配制.....	20
2.4.1.3 细胞的传代和接种.....	20
2.4.2 慢病毒包装与感染.....	21
2.4.2.1 慢病毒的包装.....	21
2.4.2.2 慢病毒感染目的细胞.....	21
2.4.3 细胞存活率.....	22
2.4.3.1 流式细胞仪测定细胞存活率.....	22
2.5 蛋白质相关实验.....	23
2.5.1 蛋白免疫印迹.....	23
2.5.2 NADH 相关测定.....	24
2.5.2.1 NADH 消耗的测定.....	24

2.5.3 线粒体的分离.....	26
2.5.4 蛋白分离实验.....	28
2.5.4.1 Superdex 200 分离蛋白	28
2.5.4.2 Q-sepharose HP 分离蛋白	29
2.5.4.3 MonoQ 分离蛋白.....	29
第三章 结果与讨论	30
3.1 TNF 诱导 RIP3 依赖的 NADH 的损耗.....	30
3.2 ROS 清除剂能抑制 TNF 诱导的 NADH 消耗.....	32
3.3 能量代谢抑制剂对 NADH 消耗的影响.....	33
3.4 ROS 通过某种蛋白导致 NADH 的消耗.....	35
3.5 分离鉴定线粒体上消耗 NADH 的蛋白.....	38
3.6 结果与分析.....	42
附录 1 图表索引	44
附录 2 缩略语及中英文对照.....	45
参考文献	48
致 谢.....	55

Table of Contents

Abstract in Chinese..... 错误！未定义书签。

Abstract in English 错误！未定义书签。

Contents in Chinese 错误！未定义书签。

Contents in English..... 错误！未定义书签。

Chapter 1 Introduction1

1.1 Necrosis 1

 1.1.1 Definition of apoptosis and necrosis..... 1

 1.1.2 Mechanism of necrosis..... 2

 1.1.2.1 Receptors and ligands of necrosis 3

 1.1.2.2 Mechanism of necrosis 4

 1.1.2.3 Role of ROS in cell death..... 7

1.2 Apoptosis and Necrosis induced by TNF7

 1.2.1 Introduction of TNF 7

 1.2.2 Apoptosis and necrosis induced by TNF 8

 1.2.3 RIP3-dependent necrosis induced by TNF 8

1.3 Receptor-interacting protein 3 (RIP3)9

 1.3.1 Introduction of RIPs..... 9

 1.3.2 Structure features of RIPs 10

1.5 Background of this thesis..... 11

Chapter 2 Materials and methods.....13

2.1 Experimental materials 13

2.2 Experimental equipments..... 13

2.3 DNA-related protocol.....13

 2.3.1 vectors 14

 2.3.1.1 RNAi vector..... 14

2.3.2 preparation of E.coli competent cells.....	15
2.3.3 DNA transformation	15
2.3.4 DNA purification	16
2.3.4.1 Mini-preparation of plasmid DNA	16
2.3.4.2 Midi-preparation of plasmid DNA	16
2.3.4.3 Maxi-preparation of plasmid DNA.....	17
2.3.5 Enzymatic manipulation of plasmid DNA.....	18
2.3.5.1 Digest plasmid with Restriction Endonuclease	18
2.3.6 DNA amplification.....	18
2.3.7 DNA purification	18
2.3.7.1 Separate DNA with agarose gel electrophoresis错误!未定义	
2.3.7.2 Recovery of DNA from agarose gel	19
2.3.8 DNA ligation.....	20
2.4 Cell-related protocols.....	20
2.4.1 Cell culture	20
2.4.1.1 Cell culture media.....	20
2.4.1.2 Preparation of PBS and cell culture media	20
2.4.1.3 Cell culture and passage	20
2.4.2 Lentivirus packing and infection.....	21
2.4.2.1 Lentivirus packing	21
2.4.2.2 Infection.....	22
2.4.3 Analysis of cell survival rate.....	22
2.4.3.1 Determination of survival rate by Flow Cytometer错误!未	
定义书签。	
2.5 Protein-related methods	23
2.5.1 Western blot	23
2.5.2 NADH related protocols	24
2.5.2.1 Determination of NADH depletion	24

2.5.3 purification of mitochondrias.....	26
2.5.4 Proteins separation.....	28
2.5.4.1 Superdex 200.....	28
2.4.4.2 Q-sepharose HP.....	29
2.4.3.3 MonoQ.....	29
Chapter 3 Results and analysis.....	30
3.1 TNF induce RIP3-dependant NADH depletion.....	30
3.2 ROS scavengers inhibit the NADH depletion.....	32
3.3 Effect of ETC inhibitors on NADH depletion rate.....	33
3.4 ROS cant oxidaize NADH directly.....	35
3.5 Pruification of protein of interest.....	38
3.5 Discussion.....	42
Appendix I Index of figures and tables.....	44
Appendix II Abbreviation.....	45
References.....	48
Acknowledgment.....	55

第一章 前言

1.1 细胞坏死

1.1.1 细胞凋亡与细胞坏死

细胞的死亡根据形态学的差异，可分为细胞凋亡（apoptosis）和细胞坏死（necrosis）。机体细胞在发育过程中受基因调控或者一定条件下发生的主动消亡称为细胞凋亡，它对于胚胎发育、形态发生、细胞损伤老化、机体免疫和防御、肿瘤的发生发展都有重要作用。细胞凋亡过程的主要特征为：（1）细胞质的皱缩，体积变小，结构变紧密；（2）细胞核固缩成均一的致密物，染色质凝集；（3）核酸内切酶激活，染色质被切割成约 180bp 整数倍的核酸片段，即核酸片段化，凝胶电泳图呈梯状；（4）细胞以出芽方式形成很多凋亡小体，其内含有结构完整的细胞器；（5）凋亡小体可以被巨噬细胞等具有吞噬功能的细胞所吞噬；（6）整个凋亡过程细胞膜完整，没有内容物的释放，不导致炎症反应（图 1.1）。

与细胞凋亡不同，细胞坏死是一类由物理因素（如高温、辐射）、化学因素（如有毒物质、强酸、强碱）或生物因素（如缺氧、病原体感染）等环境因素导致的细胞死亡的现象，细胞坏死常常伴随着炎症反应的发生。细胞坏死过程也是受到严格的调控，主要特征有：（1）线粒体、溶酶体、内质网等细胞器的肿胀破裂；（2）结构脂滴游离、空泡化；（3）嗜碱性核蛋白降解，胞质呈现强嗜酸性，细胞的微细结构消失；（4）细胞核固缩或者断裂，染色质 DNA 降解；（5）细胞膜通透性增加，细胞内的水泡胀大，胞内结构完全消失直到最后胀破；（6）细胞胀破内容物流出，可导致周围组织的炎症反应。（图 1.1）

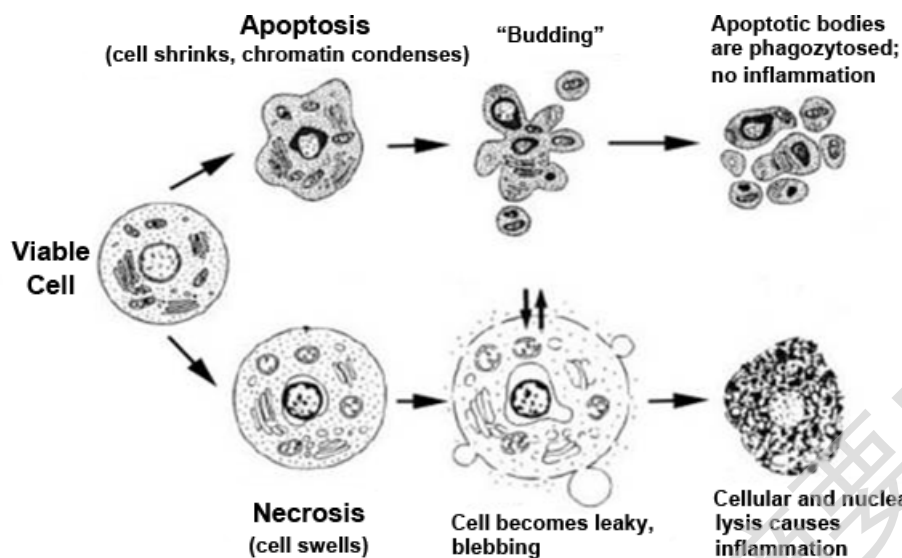


图 1.1 凋亡细胞和坏死细胞形态学上的不同过程

Fig. 1.1 The different morphology between apoptotic and necrotic cells

1.1.2 细胞坏死的机制

机体的发育和稳态是机体细胞生存和死亡动态平衡的结果。早在 1842 年，Karl Vogt 在研究两栖动物由脊索到脊椎的变态发育过程中，就意识到细胞死亡参与到该过程^[1]。但直到一个多世纪以后的 1964 年，当 Lockshin 和 Williams 阐释昆虫变态发育过程中的细胞死亡是受调控的，“程序性死亡（programmed cell death）”才被人们所认知^[2]。随后 Schweichel 和 Merker 首次报道了在有毒物质刺激下，导致的小鼠胚胎细胞三种死亡形态：异体吞噬、自吞噬和无吞噬发生的死亡^[3]，如今这三种死亡方式分别被称之为：凋亡、自吞噬和细胞坏死。人们在线虫中取得的关于细胞凋亡调控的分子机制的开创性工作^[4]，在其他多种动物模型中也得到了证实和进一步的阐释^[5, 6]。现今我们已经知道细胞死亡是受到复杂信号通路所调控，并且试图去了解细胞死亡在发育之外的作用，比如细胞死亡在趋化性、吞噬、再生和免疫中的作用^[7]。

在过去的 20 年，细胞凋亡被认为是机体发育、维持内稳态稳定、发生炎症反应时所执行的标准死亡方式^[6, 8]，而细胞坏死却被认为是物理损伤导致的不受调控的被动死亡方式。而最新的遗传学研究^[9-16]和细胞坏死抑制剂的发现，都表明了细胞坏死也是受到严格调控的死亡方式^[14, 17, 18]。

1.1.2.1 细胞坏死的受体和配基

细胞坏死研究的最多的模型为 L929 小鼠成纤维细胞在肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) 诱导下的细胞坏死。

虽然早在二十世纪八十年代就有关于肿瘤坏死因子诱导细胞坏死的研究^[19-21]，但直到相互作用蛋白 1^[10, 13, 17, 22] (receptor-interacting protein kinase 1, RIP1) 和相互作用蛋白 3^[9, 11, 12, 16] (receptor-interacting protein kinase 3, RIP3) 被证明在 TNF 诱导的细胞坏死中起到重要作用，才极大的引起人们对细胞坏死调控机制的关注。此后，一系列能引发坏死的方式被报道(图 1.2)。这些刺激物可通过激活多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1(poly(ADP-ribose)polymerase-1,PARP-1)、线粒体通透性转换(mitochondrial permeability transition, MPT)、线粒体复合体 I (mitochondrial complex I)、半胱氨酸/谷氨酸 逆向转运体 (the Cys/Glu antiporter)、坏死小体 (necrosome)、还原型辅酶 II 氧化酶(NADPH oxidases)和炎症小体等方式来激活下游的细胞坏死信号通路，导致细胞 ATP 的消耗，Ca²⁺增多，氧化还原的失衡，活性氧 (reactive oxygen species, ROS)的积聚以及磷脂酶活性的增加。该过程中相应的抑制剂可以抑制细胞坏死的过程。如 ROS 的清除剂丁基羟基茴香醚 (butylated hydroxyl anisole, BHA)和 N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-Cys, NAC) (图 1.3)。

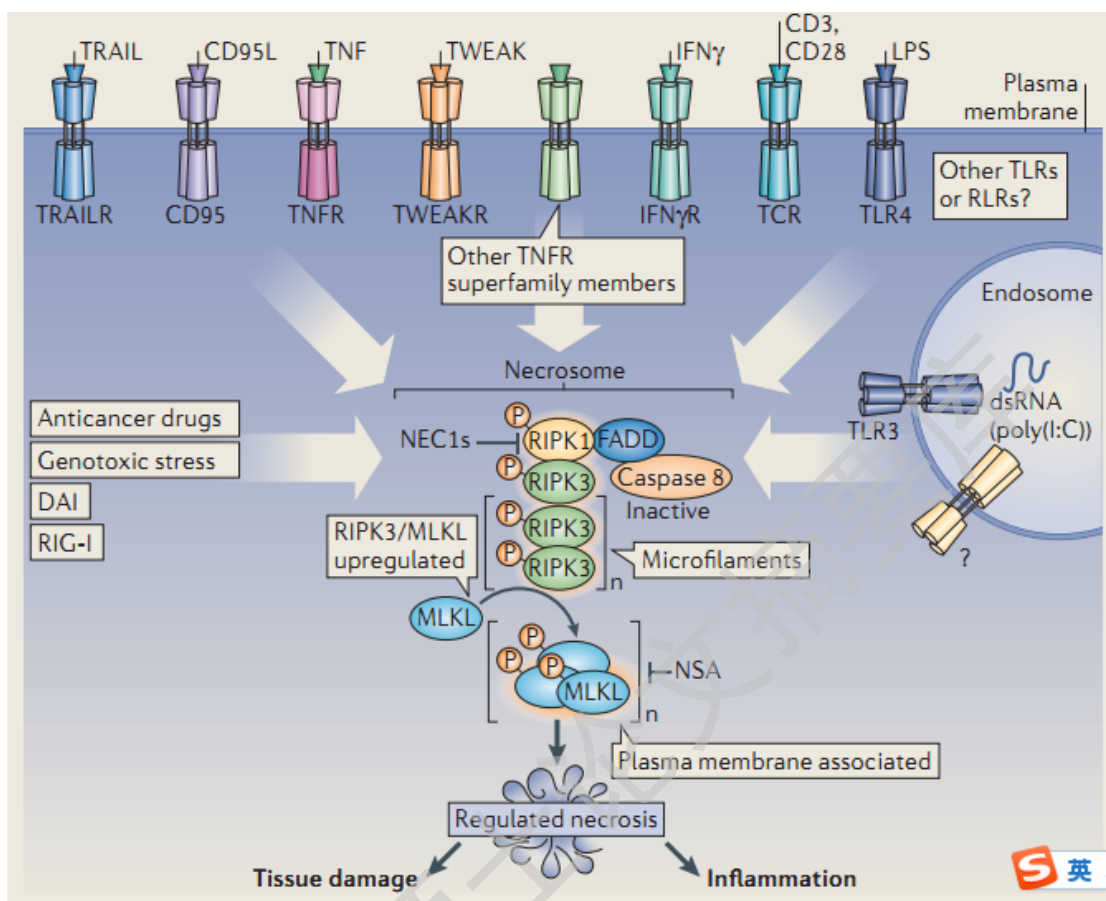


图 1.2 细胞坏死的诱导物及其引发的组织损伤和炎症反应

Fig. 1.2 Triggers of necrosis and its link to tissue damage and inflammation

1.1.2.2 细胞坏死的分子机制

由于 TNF 诱导的细胞坏死为经典的细胞坏死研究模型，所以便以 TNF 诱导坏死的信号通路进行坏死机制的介绍。

TNF 可以诱导细胞凋亡也可以诱导细胞坏死^[20, 23]，二者的区别在于，TNF 诱导的细胞凋亡需要含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny l aspartate specific proteinase, caspase)的参与和细胞色素 c 的释放^[24, 25]；而 TNF 诱导的细胞坏死是非 caspase 依赖的死亡，需要胞内 ROS 的积累^[26]。

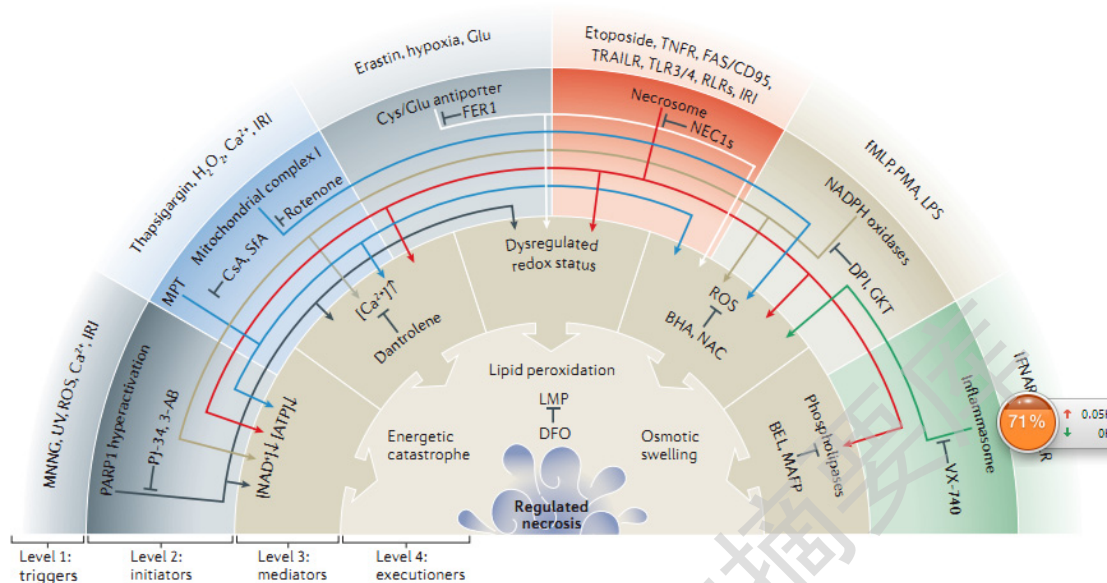


图 1.3 细胞坏死的不同模型

Fig. 1.3 An integrated view of the emerging modes of regulated necrosis

TNF 受体 (TNF receptor, TNFR) 与 TNF 结合后被激活, 募集受体相互作用蛋白 1 (receptor interaction protein 1, RIP1) 和肿瘤坏死因子 I 型受体相关的死亡结构域蛋白 (TNFR-associated death domain, TRADD) 形成复合体 I (complex I), 复合体 I 的形成对于 NF- κ B 的激活及下游抗凋亡基因如 A20 和 FLICE 样抑制蛋白 (FLICE-like inhibitory protein isoform, Flip) 的表达上调起着重要的作用 (图 1.4a)。同时 A20 的去泛素化活性可以将 RIP1 第 63 位赖氨酸的泛素链去除, 从而抑制 TNF 诱导的 NF- κ B 通路的激活, 起着负反馈调节作用^[27]。头帕肿瘤综合征蛋白 (cylindromatosis, CYLD) 也可以使 RIP1 去泛素化, 导致 RIP1 与 TNFR 的解离, 并通过 TRADD 募集 Fas 相关的死亡结构域蛋白 (FAS-associated death domain, FADD)、相互作用蛋白 3 (receptor interaction protein 3, RIP3)、FLIPs 和 pro-caspase8 结合形成死亡诱导信号复合体 (cytosolic death-inducing signalling complex, DISC), 即复合体 II a^[28] (图 1.4b)。FLIP_L 和 pro-caspase8 可以形成异源二聚体, 抑制 RIP1、RIP3 和 CYLD 的活性从而抑制细胞的坏死。同时 pro-caspase8 还可以进行自我剪切激活后脱离复合体 II a, 激活下游的 caspase3 和 caspase7 导致细胞凋亡。可是当 caspase8 的活性受到抑制的时候, RIP3 和 RIP1 会发生磷酸化^[12, 16, 29], 并导致坏死复合体的形成^[30, 31]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.